

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-155757

(43)Date of publication of application : 22.06.1993

(51)Int.Cl.

A61K 9/127

A61K 47/26

B01J 13/02

(21)Application number : 03-349051

(71)Applicant : SHISEIDO CO LTD

(22)Date of filing : 05.12.1991

(72)Inventor : NAKAJIMA HIDEO  
ANZAI SHINICHI

## (54) VESICLE AND VESICLE PREPARATION

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide a vesicle containing a sucrose fatty acid diester as a main membrane component, readily and inexpensively formable having excellent stability for a long period and useful in the fields of medicines, cosmetics, etc.

CONSTITUTION: The objective vesicle contains a composition comprising a sucrose fatty acid diester and an ionic surfactant such as a fatty acid soap preferably in an amount of 0.3-10wt.% as a main membrane component. An active ingredient is encapsuled in the vesicle to produce a vesicle preparation.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 18.09.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3126193

[Date of registration] 02.11.2000

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The vesicle which makes cane-sugar fatty-acid diester the main membrane components.

[Claim 2] Vesicle pharmaceutical preparation which comes to connote an active principle in a vesicle according to claim 1.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to amelioration of a vesicle and vesicle pharmaceutical preparation, especially its membrane component.

[0002]

[Description of the Prior Art] If drugs are microencapsulated and administration in the living body is carried out, the metabolic turnover of these drugs in the living body is controlled, and the various gropes of the microencapsulation technique of an active principle are carried out in physic, cosmetics, the food field, etc. from advantages, like drug effect is maintainable over a long period of time. The so-called liposome thru/or the so-called vesicle (closing endoplasmic reticulum which consists of lipid bilayer) attracts attention as one of them, and liposome is formed of phospholipid like lecithin or a hose FACHIJIRU inositol, and can connote drugs etc. in the film and hollow.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, generally, phospholipid lacks thermal resistance, is unstable matter, and since it is moreover comparatively expensive, it is not so practical. Moreover, such a vesicle had the technical problem that the structure itself was generally unstable and it was not suitable for long-term preservation. Although a vesicle is covered with polysaccharide or the phospholipid which strengthened structure by hydrogen bond is developed in order to improve this point, all have come to offer a satisfying vesicle. It is in obtaining the vesicle in which this invention is made in view of the technical problem of said conventional technique, the purpose is stable over a long period of time, and no problems of an endocyst drug, such as a leak, are.

[0004]

[Means for Solving the Problem] In order to attain said purpose, as a result of this invention persons' advancing examination wholeheartedly, it came to complete a header and this invention for very stable vesicle structure being acquired below by  $T_c$  (gel-liquid crystal transition temperature) of cane-sugar fatty-acid diester by manufacturing the vesicle which makes cane-sugar fatty-acid diester the main membrane components. That is, the vesicle of this application according to claim 1 is a bimolecular membrane closing endoplasmic reticulum which makes cane-sugar fatty-acid diester the main membrane components. Moreover, it is characterized by vesicle pharmaceutical preparation according to claim 2 coming to connote an active principle in a vesicle according to claim 1.

[0005] Hereafter, the configuration of this invention is explained to a detail. The fatty acid in cane-sugar fatty-acid diester may have the straight chain or branching of the saturation of carbon numbers 12-22, or partial saturation, and two fatty acids may differ. However, it is necessary to blend 0.2 - 15% of the weight of an ionic surfactant to diester as a vesicle formation agent, and since it is very hard to distribute cane-sugar fatty-acid diester in water also in the temperature more than  $T_c$ , desirable loadings are 0.3 - 10%, and still more desirable loadings are 0.5 - 5%. If there are too many amounts of ionic surfactants, a vesicle will not be formed or the stability will fall.

[0006] As an ionic surfactant, fatty-acid soap, an ether carboxylic acid, and its salt, An alkane sulfonate, the sulfonate of higher-fatty-acid ester, dialkyl sulfo succinate, The sulfonate of a higher-fatty-acid amide, an alkyl allyl compound sulfonate, fatty alcohol sulfate, The second class fatty alcohol sulfate, alkyl, and an alkyl allyl compound ethereal sulfate ester salt, The sulfate salt of a glycerine fatty acid ester, the sulfate salt of a higher-fatty-acid ARUKI roll amide, Sulfated oil, phosphate, amino acid, collagen hydrolyzate and a higher-fatty-acid

condensate, An anionic surfactant, alkylamine salts, such as a collagen hyaluronate derivative, Polyamine or an alkanolamine fatty-acid derivative, an alkyl trimethylammonium salt, Cationic surface active agents, such as a dialkyl dimethylammonium salt, an alkyl dimethylbenzyl ammonium salt, alkyl pyridinium salt, an alkyl isoquinolinium salt, and a dialkyl morpholinium salt, etc. can be used.

[0007] It is the with a carbon numbers of 12 or more fatty-acid soap which has an anionic surface active agent and a cationic surface active agent at best especially desirable [ a desirable ionic surfactant ], and it has Na, K, triethanolamine, ammonia, etc. as a desirable counter ion. The stability of a vesicle improves further by adding amphiphile to the above-mentioned vesicle formation agent. Although amphiphile has surface activity, a more common surfactant with powerful hydrophobicity has in itself the compound (cholesterol, phytosterol) which does not have the surface activity effectiveness and has a higher fatty acid, high-class fatty alcohol, a monoglyceride, glycerol monoalkyl ether, a monoalkyl amine, and a sterol frame. The carbon number of these hydrophobic groups has 12 or more preferably good things. They are a higher fatty acid and/or high-class fatty alcohol preferably in these matter. Moreover, these loadings are 0 - 30% to the above-mentioned vesicle formation agent, and are 0.5 - 10% preferably.

[0008] Moreover, although a vesicle can be formed into cane-sugar fatty-acid diester even if other sucrose fatty acid ester, for example, monoester, and triester contain as an impurity, those content is to 50% at the maximum, and is 30% or less still more preferably 40% or less preferably.

[0009] The vesicle in this invention can contain pure water in a lipid membrane, and can contain a water solution or aqueous suspension. A water solution or aqueous suspension may contain water solubility, half-water solubility, or the water-insoluble nature matter as components other than water. As such matter, a drug (it is the matter aiming at the medical effectiveness, and, naturally, the physiological active substance which exists in the inside of the body is included in a different amount besides the matter which does not exist in the inside of the body), and an indicator object (matter which is prescribed for the patient for the purpose, such as a diagnosis, and may generate a detectable signal) are included.

[0010] All compounds are applicable, unless it causes a vesicle component and an interaction and deterioration etc. is carried out as a compound which can be connoted. In addition, this vesicle pharmaceutical preparation can be applied not only to a physic field but to the cosmetics field and the food field.

[0011] The following are mentioned as an example of an applicable compound. Various enzyme; DNA, such as cytochrome P-450, a cytochrome P-450 reductase, and SOD, The gene related substance of RNA sugar; \*\*\*\*\*-KIN, interferon-alpha, - beta and - physiological active substance; prostaglandin [ , such as gamma, TPA, lymphotoxin, and cel RETAIDO, ]; etc. -- others -- painkilling, alleviation of fever, and an antiinflammatory drug (for example, ergot alkaloid, morphine, and pentazocine --) Aspirin, ibuprofen, indomethacin, acetaminophen, etc., pneumonia and the medicine for nervous diseases (for example, JIAZEBAMU, ethosuximide, and phenytoin --) Cull BAMAZEBIN, phenobarbital, sodium valproate, levodopa, Trihexyphenidyl hydrochloride, amantadine hydrochloride, imipramine hydrochloride, Amitriptyline hydrochloride, a clo RUJIAZEBOKI side, chlorpromazine hydrochloride, an alignment and the medicine for vascular diseases (for example, digoxin and the dobutamine --), such as haloperidol Isoproterenol, EBINEFURIN, propranolol, nifedipine, Quinidine, a hydrazine, hydrochlorothiazide, reserpine, a prazosin, GUANECHIJIN, furosemide, chlortalidone, spironolactone, etc., antiallergic and the antiasthmatic (for example, diphenhydramine and chlorpheniramine maleate --) Disodium cromoglycate, salbutamol sulfate, ipratropium bromide, etc., anti-rheumatism and an agent against gout (for example, phenyl PUTAZON and D-penicillamine --) An immunosuppressant, allopurinol, sulfinpyrazone, naproxen, etc., an antimicrobial agent (for example, a penicillins antimicrobial agent, a cephalosporin antimicrobial agent, and gentamycin --) The minocycline, an erythromycin, rifampicin, isoniazid, A kanamycin, a griseofulvin, nystatin, a diphtheria antitoxin, an anti-parasite and antiprotozoan drugs (for example, metronidazole --), such as antivenin serum and a vaccine antitumor and antileukemic agents (for example, a PUSURU fan --), such as dehydroemetine, suramin sodium, and niclosamide Cyclophosphamide, PUREO mycin, fluorouracil, methotrexate, etc., Antilipidemic and an antidiabetic drug (for example, clofibrate, tolbutamide, chlorpropamide, etc.), the medicine for hemopathies (for example, a fibrinogen, factor VIII, and heparin --) medicine for digestive organs (for example, an acrinol and diastase --), such as cyanocobalamin hormone analogous drugs (for example, hydrocortisone and prednisolone --), such as pancreatin TEKISAMESAZON, methyltestosterone, estrogen, an insulin, vitamins (for example, vitamin A, activity form vitamin B1, and vitamin C --), such as levothyroxine Nourishment alterants (for example, aspartic-acid calcium, an isoleucine, ferrous orotate, etc.), the medicine for envelopes, whitening agents, etc. (for example, hydroquinone, arbutin, etc.), such as vitamin E and pantothenic acid, are illustrated.

[0012] As an indicator object, an x-ray contrast medium (for example, metrizamide, metrizoic acid), radioactivity or nonradioactive (stability) isotope pharmaceutical preparation, the other pharmaceutical preparation for CT, etc. are included. And the vesicle in this invention adds said vesicle formation agent to water or a water solution, it is beyond T<sub>c</sub> temperature (gel-liquid crystal transition temperature), and after making water swell a vesicle formation agent enough, it is agitated and mixed and is adjusted. After the conventional vesicle forming method according to this approach had the thin film of a vesicle formation agent (for example, lecithin + cholesterol) formed using an organic solvent, Although water or a water solution is made to swell enough, for example, minute liposome is obtained by ultrasonic irradiation (546 \*\*\*\*\* experimental science lecture and . Tokyo Kagaku Dojin [ edited by the Japanese Biochemical Society ] . V.3, P 1985) Even if it does not thin-film-ize the vesicle formation agent of this invention using an organic solvent, it can adjust a vesicle easily. It has the features that the liposome of the one-sheet film with a diameter of about 0.2 micrometers is obtained only by the usual mechanical agitation (for example, TK homomixer), and a vesicle with still higher rates of incorporation, such as a drug, is obtained.

[0013] Moreover, the vesicle of this invention is obtained by the above-mentioned reference book P541-547 by other approaches of a publication. Thus, the stability of the obtained vesicle becomes good especially below at T<sub>c</sub> temperature. In addition, the addition of said vesicle formation agent at the time of forming a vesicle has 0.1 - 10 desirable % of the weight.

[0014]

[Function] As mentioned above, the hollow duplex film ball is formed by making cane-sugar fatty-acid diester into the main membrane components, in order that this film may take the stable gel structure as that temperature is below the Krafft point, vesicle structure is solid, and the vesicle concerning this invention has few leaks of the drugs to connote, and moreover is not condensed, but is extremely stable. Formation of a vesicle is easily possible by on the other hand manufacturing above the Krafft point. Moreover, there are the features that rates of incorporation, such as a drug, are high.

[0015]

[Example] Hereafter, the example of this invention is explained. In addition, the technical range of this invention is not limited by the example. Moreover, as long as there is especially no assignment, weight % shows loadings. First, in this invention, the manufacture approach of characteristic cane-sugar fatty-acid diester is explained.

[0016] Example 1 of manufacture 100g of commercial cane-sugar stearic acid ester supposed that monoester is included in the purification \*\* 1l. beaker of cane-sugar stearin acid diester 30% is \*\*\*\*(ed), methanol 855ml and 45ml mixed liquor of water are added, and a sample is once dissolved at the temperature near the boiling point of a solvent. After keeping a solution warm at 44 degrees C after that and making it separate into a bilayer, the upper layer (solution phase) is isolated preparatively. In addition, the principal component of a lower layer (solid-state phase) is triester, and monoester and diester are mainly contained in the upper layer.

\*\* Make precipitate generate at 25 degrees C, and isolate this precipitate preparatively, after warming water at 60 degrees C in addition at this upper layer so that methanol concentration may serve as abbreviation 80 v/v%. Besides a layer uses monoester as a principal component, and precipitate uses diester as a principal component.

Dissolve the precipitate obtained by \*\* \*\* in methanol 720ml, in the solution, add 180ml of water and stir it, and keep warm and put at 25 degrees C, precipitate is made to generate, and the precipitate is isolated preparatively.

\*\* \*\* was able to be operated again and the constituent which contains cane-sugar stearin acid diester 80% or more was able to be obtained. As an inclusion which exists in addition to cane-sugar stearin acid diester, they were cane-sugar stearin acid monoester and triester, stearin acid, a sodium stearate, etc. In addition, the yield to raw material sucrose fatty acid ester was about 33%.

[0017] Example 2 of manufacture Silica gel 200g for column chromatographies of a commercial item is made to swell by using purification \*\* chloroform 400ml by the column chromatography of cane-sugar stearin acid diester as a solvent, a column is filled up as the shape of a slurry, and about 10g of cane-sugar stearic acid ester obtained according to the manufacturing method 1 is added.

\*\* Perform stepwise elution, using the following solvents one by one.

i) Methanol: Chloroform =8:92(volume ratio) 1lii Methanol: Chloroform =15:85(volume ratio) 1liii Methanol: The identification of a component which carried out fractionation of every 70ml of the chloroform =25:75(volume ratio) 1l. eluates, and carried out fractionation to the gas chromatography using TLC, and the check of purity were performed. When the diester fraction was condensed, about 4g of cane-sugar stearin acid diester of 99% or

more (an impurity was not detected by a gas chromatography and TLC) of purity has isolated preparatively. [0018] Example 3 of manufacture Silica gel 200g for the column chromatographies of a commercial item is made to swell by using purification \*\* chloroform 400ml by the column chromatography of cane-sugar oleic acid diester as a solvent, a column is filled up, and about 10g of cane-sugar oleate is added.

\*\* Perform stepwise elution, using the following solvents one by one.

i) Methanol: Chloroform =6:94(volume ratio) 1lii Methanol: Chloroform =12:88(volume ratio) 1liii Methanol: The identification of a component which carried out fractionation of every 70ml of the chloroform =20:80(volume ratio) 1l. eluates, and carried out fractionation to the gas chromatography using TLC, and the check of purity were performed. When the diester fraction was condensed, about 2.5g of cane-sugar stearin acid diester of 99% or more (an impurity was not detected by a gas chromatography and TLC) of purity has isolated preparatively. Next, the example of the vesicle and vesicle pharmaceutical preparation using the cane-sugar fatty-acid diester obtained by said example of manufacture is explained concretely.

[0019] After adding 1g (cane-sugar stearin acid diester (example 2 of manufacture) 97%, and stearyl trimethylammonium chloride 1%, and cetostearyl-alcohol 2%) of vesicle formation agents to 99g of 2 % of the weight water solutions of example 1 arbutin and making it fully swell at 60 degrees C, it processed for 1 minute by the poly TRON, and cooled at 25 degrees C immediately, and the arbutin endocyst vesicle was adjusted. By sephadex G-50, gel filtration of this thing was carried out at about 25 degrees C, and it separated into the vesicle which connoted arbutin, and the arbutin in the outside aqueous phase. In addition, as an eluate, the grape-sugar water solution (the 2 % of the weight water solution of arbutin and isotonicity) was used 1.32% of the weight. The whole quantity of a vesicle fraction was mixed with the ethanol of an amount 4 times, it filtered using the 0.22-micrometer filter, and the quantum of the amount (ain) of arbutin by which endocyst was carried out to the vesicle was carried out by measuring UV absorption (282nm). The quantum also of the whole quantity (aout) of the arbutin in the outside aqueous phase was carried out to coincidence. The sum total of both the quanta value was in agreement with the whole quantity of the blended arbutin. As a result of asking for rate =ain/(aout+ain) xof incorporation100(%) from this, the rate of incorporation was 20.5%.

[0020] Moreover, the mean particle diameter of this vesicle measured by NICOMP-270 (dynamic light scattering) was 210nm. Next, the burst size of the arbutin by which endocyst was carried out estimated the stability of this vesicle. It asked for rate =(Co-Ct)/Coxof emission100(%) with the quantum value of the arbutin concentration (Co) by which carried out the quantum of the arbutin concentration (Ct) by which saves the vesicle refined by the above-mentioned gel filtration to the temperature of 5 degrees C, 25 degrees C, 37 degrees C, and 50 degrees C, and carries out gel filtration of this again after the passage of time, and endocyst is carried out to the vesicle, and endocyst was carried out to the vesicle immediately after purification. Although the result becomes [ the rate of emission ] about 90% one day after and was unstable in 50 degrees C, in 37 degrees C, 25 degrees C, and 5 degrees C, the rate of emission was about 0% respectively 60 days after. In addition, also in thing [ any ] conditions, 60 days or more of distributed stability were good.

[0021] 98g of 2 % of the weight water solutions of example 2 arbutin -- a vesicle formation agent (cane-sugar stearin acid diester refined in the example 1 of manufacture) -- after adding 2g and making it fully swell at 60 degrees C, it processed for 1 minute by the poly TRON, and cooled at 25 degrees C immediately, and the arbutin endocyst vesicle was adjusted. By sephadex G-50, gel filtration of this thing was carried out at about 25 degrees C, and it separated into the vesicle which connoted arbutin, and the arbutin in the outside aqueous phase. In addition, as an eluate, the grape-sugar water solution (the 2 % of the weight water solution of arbutin and isotonicity) was used 1.32% of the weight. The whole quantity of a vesicle fraction was mixed with the ethanol of an amount 4 times, it filtered using the 0.22-micrometer filter, and the quantum of the amount (ain) of arbutin by which endocyst was carried out to the vesicle was carried out by measuring UV absorption (282nm). The amount (aout) of arbutin which is in coincidence at the outside aqueous phase was also measured. The sum total of both the quanta value was in agreement with the whole quantity of the blended arbutin. Asking for rate =ain/(aout+ain) xof incorporation100(%) from this, the rate of incorporation was 28.2%.

[0022] Moreover, the mean particle diameter of this vesicle measured by NICOMP-270 (dynamic light scattering) was 215nm. Next, the burst size of the arbutin by which endocyst was carried out estimated the stability of this vesicle. It asked for rate =(Co-Ct)/Coxof emission100(%) with the quantum value of the arbutin concentration (Co) by which carried out the quantum of the arbutin concentration (Ct) by which saves the vesicle refined by the above-mentioned gel filtration to the temperature of 5 degrees C, 25 degrees C, 37 degrees C, and 50 degrees C, and carries out gel filtration of this again after the passage of time, and endocyst is carried out to the vesicle, and endocyst was carried out to the vesicle immediately after purification. Although the result becomes

[ the rate of emission ] about 90% one day after and was unstable in 50 degrees C, in 37 degrees C, 25 degrees C, and 5 degrees C, the rate of emission was about 0% respectively 60 days after. In addition, also in thing [ any ] conditions, 60 days or more of distributed stability were good.

[0023] 99g of 2 % of the weight water solutions of example 3 arbutin -- a vesicle formation agent (cane-sugar stearin acid diester 97% and stearyl sulfuric-acid Na1%, cetostearyl-alcohol 2%) -- after adding 1g and making it fully swell at 60 degrees C, it processed for 1 minute by the poly TRON, and cooled at 25 degrees C immediately, and the arbutin endocyst vesicle was adjusted. By sephadex G-50, gel filtration of this thing was carried out at about 25 degrees C, and it separated into the vesicle which connoted arbutin, and the arbutin in the outside aqueous phase. In addition, as an eluate, the grape-sugar water solution (the 2 % of the weight water solution of arbutin and isotonicity) was used 1.32% of the weight. The whole quantity of a vesicle fraction was mixed with the ethanol of an amount 4 times, it filtered using the 0.22-micrometer filter, and the quantum of the amount (ain) of arbutin by which endocyst was carried out to the vesicle was carried out by measuring UV absorption (282nm). The quantum of the amount (aout) of arbutin in the outside aqueous phase was carried out to coincidence. The sum total of both the quanta value was in agreement with the whole quantity of the blended arbutin. As a result of asking for rate  $=ain/(aout+ain)$  xof incorporation100(%) from this, the rate of incorporation was 21.0%.

[0024] Moreover, the mean particle diameter of this vesicle measured by NICOMP-270 (dynamic light scattering) was 205nm. Next, the burst size of the arbutin by which endocyst was carried out estimated the stability of this vesicle. It asked for rate  $=(Co-Ct)/Cox$  of emission100(%) with the quantum value of the arbutin concentration (Co) by which carried out the quantum of the arbutin concentration (Ct) by which saves the vesicle refined by the above-mentioned gel filtration to the temperature of 5 degrees C, 25 degrees C, 37 degrees C, and 50 degrees C, and carries out gel filtration of this again after the passage of time, and endocyst is carried out to the vesicle, and endocyst was carried out to the vesicle immediately after purification. Although the result becomes [ the rate of emission ] about 90% one day after and was unstable in 50 degrees C, in 37 degrees C, 25 degrees C, and 5 degrees C, the rate of emission was about 0% respectively 60 days after. In addition, also in which conditions, 60 days or more of distributed stability were good.

[0025] 98g of 2 % of the weight water solutions of example 4 arbutin -- a vesicle formation agent (92% (example 3 of manufacture) of cane-sugar oleate, oleic acid potassium 3%, 5% of oleic acid) -- after adding 2g and making it fully swell at 60 degrees C, it processed for 1 minute by the poly TRON, and cooled at 5 degrees C immediately, and the arbutin endocyst vesicle was adjusted. By sephadex G-50, gel filtration of this thing was carried out at about 5 degrees C, and it separated into the vesicle which connoted arbutin, and the arbutin in the outside aqueous phase. In addition, as an eluate, the grape-sugar water solution (the 2 % of the weight water solution of arbutin and isotonicity) was used 1.32% of the weight. The whole quantity of a vesicle fraction was mixed with the ethanol of an amount 4 times, it filtered using the 0.22-micrometer filter, and the quantum of the amount (ain) of arbutin by which endocyst was carried out to the vesicle was carried out by measuring UV absorption (282nm). The quantum of the amount (aout) of arbutin in the outside aqueous phase was carried out to coincidence. The sum total of both the quanta value was in agreement with the whole quantity of the blended arbutin. As a result of asking for rate  $=ain/(aout+ain)$  xof incorporation100(%) from this, the rate of incorporation was 30.3%.

[0026] Moreover, the mean particle diameter of this vesicle measured by NICOMP-270 (dynamic light scattering) was 210nm. Next, the burst size of the arbutin by which endocyst was carried out estimated the stability of this vesicle. It asked for rate  $=(Co-Ct)/Cox$  of emission100(%) with the quantum value of the arbutin concentration (Co) by which carried out the quantum of the arbutin concentration (Ct) by which saves the vesicle refined by the above-mentioned gel filtration to the temperature of 5 degrees C, 25 degrees C, 37 degrees C, and 50 degrees C, and carries out gel filtration of this again after the passage of time, and endocyst is carried out to the vesicle, and endocyst was carried out to the vesicle immediately after purification. The result becomes 90%, 72%, and 43% and was unstable [ the rate of emission of one day after ] respectively in 50 degrees C, 37 degrees C, and 25 degrees C, although the rate of emission was very stable at 0% 60 days after in 5 degrees C.

[0027]

[Effect of the Invention] Since cane-sugar fatty-acid diester was made into the main membrane components according to the vesicle and vesicle pharmaceutical preparation concerning this invention as explained above, it becomes possible to form an easy and cheaply stable vesicle.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3126193号  
(P3126193)

(45) 発行日 平成13年 1 月22日 (2001. 1. 22)

(24) 登録日 平成12年11月 2 日 (2000. 11. 2)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/127

47/26

47/26

B 0 1 J 13/02

B 0 1 J 13/02

Z

請求項の数 2 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平3-349051

(22) 出願日 平成 3 年12月 5 日 (1991. 12. 5)

(65) 公開番号 特開平5-155757

(43) 公開日 平成 5 年 6 月22日 (1993. 6. 22)

審査請求日 平成10年 9 月18日 (1998. 9. 18)

(73) 特許権者 000001959

株式会社資生堂

東京都中央区銀座7丁目5番5号

(72) 発明者 中島 英夫

神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地

株式会社 資生堂研究所内

(72) 発明者 安齋 伸一

神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地

株式会社 資生堂研究所内

(74) 代理人 100092901

弁理士 岩橋 祐司

審査官 今村 玲英子

(56) 参考文献 特開 昭61-207324 (J P, A)

(58) 調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, D B名)

A61K 9/127, 47/26

(54) 【発明の名称】 ベシクル及びベシクル製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ショ糖脂肪酸ジエステルと、該ジエステルに対し 0. 2 ～ 1 5 重量% のイオン性界面活性剤とを含む、前記ショ糖脂肪酸ジエステルを主な膜成分とすることを特徴とするベシクル。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のベシクル内に有効成分を内包してなるベシクル製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はベシクルおよびベシクル製剤、特にその膜成分の改良に関する。

【0002】

【従来の技術】 薬剤をマイクロカプセル化し生体内投与すると、該薬剤の生体内における代謝が抑制され、薬効を長期間にわたって維持できること等の利点から、医

薬、化粧品、食品分野等で有効成分のマイクロカプセル化技術が各種模索されている。その一つとしていわゆるリポソームないしベシクル（脂質二分子膜からなる閉鎖小胞体）が注目されており、リポソームはレシチンやホオスファチジルイノシトールのようなリン脂質により形成され、その膜内及び中空内に薬剤等を内包できる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 ところが、一般にリン脂質は耐熱性を欠き、不安定な物質であり、しかも比較的高価であるため余り実用的でない。またこのようなベシクルは構造自体が一般に不安定で、長期の保存に適さないという課題があった。この点を改良するためにベシクルを多糖類で被覆したり、水素結合によって構造を強化したリン脂質等が開発されているが、いずれも満足のいくベシクルを提供するには至っていない。本発明は前



記従来技術の課題に鑑みなされたものであり、その目的は長期にわたって安定で、内包薬物の洩れ等の問題がないベシクルを得ることにある。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するために本発明者等が鋭意検討を進めた結果、イオン性界面活性剤の存在下、ショ糖脂肪酸ジエステルを主な膜成分とするベシクルを製造することにより、ショ糖脂肪酸ジエステルのT<sub>c</sub>（ゲル-液晶転移温度）以下で極めて安定なベシクル構造が極めて容易に得られることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明にかかるベシクルは、ショ糖脂肪酸ジエステルと、該ジエステルに対し0.2～15重量%のイオン性界面活性剤とを含み、前記ショ糖脂肪酸ジエステルを主な膜成分とすることを特徴とする。また、本発明にかかるベシクル製剤は、前記ベシクル内に有効成分を内包してなることを特徴とする。

【0005】以下、本発明の構成を詳細に説明する。ショ糖脂肪酸ジエステルにおける脂肪酸は炭素数12～22の飽和または不飽和の、直鎖あるいは分岐をもつものであり、二つの脂肪酸は異なってもよい。但し、ショ糖脂肪酸ジエステルはT<sub>c</sub>以上の温度においても極めて水に分散し難いため、ベシクル形成剤としては、ジエステルに対して0.2～15重量%のイオン性界面活性剤を配合する必要がある、好ましい配合量は0.3～10%、更に好ましい配合量は0.5～5%である。イオン性界面活性剤量が多過ぎるとベシクルを形成しないかあるいはその安定性が低下する。

【0006】イオン性界面活性剤としては、脂肪酸石鹼、エーテルカルボン酸およびその塩、アルカンサルホン酸塩、高級脂肪酸エステルのスルホン酸塩、ジアルキルスルホコハク酸塩、高級脂肪酸アミドのスルホン酸塩、アルキルアリルスルホン酸塩、高級アルコール硫酸エステル塩、二級高級アルコール硫酸エステル塩、アルキルおよびアルキルアリルエーテル硫酸エステル塩、グリセリン脂肪酸エステルの硫酸エステル塩、高級脂肪酸アルキロールアミドの硫酸エステル塩、硫酸化油、リン酸エステル塩、アミノ酸、コラーゲン加水分解物と高級脂肪酸縮合物、コラーゲン加水分解物誘導体等のアニオン性界面活性剤、およびアルキルアミン塩、ポリアミンまたはアルカノールアミン脂肪酸誘導体、アルキルトリメチルアンモニウム塩、ジアルキルジメチルアンモニウム塩、アルキルジメチルベンジルアンモニウム塩、アルキルピリジニウム塩、アルキルイソキノリニウム塩、ジアルキルモルホリニウム塩等のカチオン界面活性剤等を用いることができる。

【0007】好ましいイオン性界面活性剤はアニオン界面活性剤及びカチオン界面活性剤がよく、特に好ましいものは炭素数12以上の脂肪酸石ケンであり、好ましい対イオンとしてはNa、K、トリエタノールアミン、ア

ンモニア等がある。上記ベシクル形成剤に両親媒性物質を添加することによりベシクルの安定性は更に向上する。両親媒性物質とは界面活性を有するが、それ自体は疎水性が強く一般の界面活性剤ほど界面活性効果を有さないものであり、例えば高級脂肪酸、高級脂肪族アルコール、モノグリセリド、グリセロールモノアルキルエーテル、モノアルキルアミン、およびステロール骨格を有する化合物（コレステロール、フィステロール）等がある。これらの疎水基の炭素数は好ましくは12以上のものがよい。これらの物質の中で好ましくは高級脂肪酸および/または高級脂肪族アルコールである。またこれらの配合量は上記ベシクル形成剤に対して0～30%であり、好ましくは0.5～10%である。

【0008】またショ糖脂肪酸ジエステル中に、他のショ糖脂肪酸エステル、例えばモノエステルやトリエステルが不純物として含有されていてもベシクルは形成できるが、それらの含有率は最大で50%までであり、好ましくは40%以下、更に好ましくは30%以下である。

【0009】この発明におけるベシクルは、脂質膜内に純水を含むことができ、また水溶液または水性懸濁液を含むことができる。水溶液または水性懸濁液は、水以外の成分として、水溶性または半水溶性または水不溶性物質を含み得る。このような物質としては、薬物（医療効果を目的とする物質であって、天然には体内に存在しない物質のほか、異なった量で天然に体内に存在する生理活性物質を含む）および標識体（診断等の目的で投与され、検出可能な信号を発生し得る物質）が含まれる。

【0010】内包しうる化合物としては、ベシクル成分と相互作用を起こして変質等しない限り、全ての化合物が適用可能である。尚、本ベシクル製剤は医薬分野に限らず、化粧品分野や食品分野にも応用しうる。

【0011】適用可能な化合物の一例として以下のものが挙げられる。チトクロームP450、チトクロームP450還元酵素、SOD等の各種酵素類；DNA、RNA糖の遺伝子関連物質；インターリューキン類、インターフェロン- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$ 、TPA、リンホトキシン類、セルレタイド等の生理活性物質；プロスタグランジン類；等の他、鎮痛、解熱、抗炎症薬（例えば麦角アルカロイド、モルヒネ類、ペンタゾシン、アスピリン、イブプロフェン、インドメタシン、アセトアミノフェン等）、精神・神経疾患用薬（例えばジアゼパム、エトスクシミド、フェニトイン、カルバマゼピン、フェノバルビタール、バルプロ酸ナトリウム、レボドパ、塩酸トリヘキシフェニジル、塩酸アマンタジン、塩酸イミプラミン、塩酸アミトリプチリン、クロルジアゼポキサイド、塩酸クロルプロマジン、ハロペリドール等）、心・血管疾患用薬（例えばジゴキシン、ドブタミン、イソプロテレノール、エビネフリン、プロプラノロール、ニフェジピン、キニジン、ヒドラジン、ヒドロクロロチアジド、レセルピン、プラゾシン、グアネチジン、フロセミド、

クロルタリドン、スピロラクトン等)、抗アレルギー・抗ぜん息薬(例えばジフェンヒドラミン、マレイン酸クロルフェニラミン、クロモグリク酸ナトリウム、硫酸サルブタモール、臭化イプラトロピウム等)、抗リウマチ・痛風薬(例えばフェニルブタゾン、D-ペニシラミン、免疫抑制剤、アロプリノール、スルフィンピラゾン、ナプロキセン等)、抗菌剤(例えばペニシリン系抗菌剤、セファロスポリン系抗菌剤、ゲンタマイシン、ミノサイクリン、エリスロマイシン、リファンピシン、イソニアジド、カナマイシン、グリセオフルビン、ナイスタチン)、ジフテリア抗毒素、抗蛇毒血清やワクチン等、抗寄生虫・抗原虫薬(例えばメトロニダゾール、デヒドロエメチン、スラミンナトリウム、ニクロサミド等)、抗腫瘍・抗白血病薬(例えばブスルファン、シクロホスファミド、ブレオマイシン、フルオロウラシル、メトトレキサート等)、抗脂血・抗糖尿病薬(例えばクロフィブラート、トルブタミド、クロルプロバミド等)、血液疾患用薬(例えばフィブリノーゲン、第VIII因子、ヘパリン、シアノコバラミン等)、消化器管用药(例えばアクリノール、ジアスターゼ、パンクレアチン等)ホルモン関連薬(例えばヒドロコルチゾン、プレドニソロン、テキサメサゾン、メチルテストステロン、エストロジェン、インシュリン、レボチロキシン等)、ビタミン(例えばビタミンA、活性形ビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンC、ビタミンE、パントテン酸等)、滋養変質薬(例えばアスパラギン酸カルシウム、イソロイシン、オロチン酸第一鉄等)、外用薬、美白剤(例えばハイドロキノン、アルブチン等)等が例示される。

【0012】標識体としては、X線造影剤(例えばメトリザミド、メトリソ酸)、放射性または非放射性(安定)同位元素製剤、そのほかのCT用製剤等が含まれる。そして、本発明におけるベシクルは、例えば、水または水溶液に前記ベシクル形成剤を加え、T<sub>c</sub>温度(ゲル-液晶転移温度)以上で、ベシクル形成剤を十分水に膨潤させた後、攪拌・混合し、調整される。この方法に準じた従来のベシクル形成法は、有機溶媒を用いて、ベシクル形成剤(例えばレシチン+コレステロール)の薄膜を形成された後、水または水溶液に十分膨潤させ、例えば超音波照射により微小なリポソームを得る(続生化学実験化学講座、日本生化学会編、東京化学同人、V、3、P546、1985)ものであるが、本発明のベシクル形成剤は有機溶媒を用いて薄膜化しなくとも、容易にベシクルが調整でき、通常の機械的攪拌(例えばTKホモミキサー)のみで直径0.2μm程度の1枚膜のリポソームが得られ、更に薬物等の取り込み率が高いベシクルが得られるという特長を有する。

【0013】また、上記参考書P541~547に記載の他の方法によっても本発明のベシクルが得られる。このようにして得られたベシクルの安定性は、T<sub>c</sub>温度以下で特に良好となる。なお、ベシクルを形成する際の

前記ベシクル形成剤の添加量は0.1~10重量%が好ましい。

#### 【0014】

【作用】本発明にかかるベシクルは前述したように、シヨ糖脂肪酸ジエステルを主な膜成分として中空二重膜球が形成されており、その温度がクラフト点以下であるとこの膜は安定なゲル構造をとるため、ベシクル構造がしっかりしており、内包する薬剤のもれが少なく、しかも凝集せず安定性が高い。一方、クラフト点以上で製造を行なうことにより、容易にベシクルの形成が可能である。また、薬物等の取り込み率が高いという特長がある。

#### 【0015】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明する。なお、実施例によって本発明の技術的範囲が限定されるものではない。また、特に指定がない限り、配合量は重量%で示す。まず、本発明において特徴的なシヨ糖脂肪酸ジエステルの製造方法について説明する。

#### 【0016】製造例1 シヨ糖ステアリン酸ジエステルの精製

- ① 1 l ビーカーにモノエステルを30%含むとされる市販シヨ糖ステアリン酸エステル100gを秤取し、メタノール85mlと水45ml混合液を加えて溶媒の沸点近傍の温度で一度試料を溶解する。その後溶液を4.4℃に保温し、二層に分離させた後、上層(溶液相)を分取する。なお、下層(固体相)の主成分はトリエステルであり、上層にはモノエステル及びジエステルが主に含まれる。
- ② この上層に、水をメタノール濃度が約80v/v%となるように加え60℃に加温した後、25℃にて沈殿物を生成させ、該沈殿物を分取する。この上層はモノエステルを主成分とし、沈殿はジエステルを主成分とする。
- ③ ②で得られた沈殿物をメタノール720mlに溶解し、その溶液に水を180ml加えて攪拌し、25℃にて保温・静置して沈殿物を生成させ、その沈殿物を分取する。
- ④ ③の操作を再度行ない、シヨ糖ステアリン酸ジエステルを80%以上含む組成物を得ることができた。シヨ糖ステアリン酸ジエステル以外に存在する含有物としては、シヨ糖ステアリン酸モノエステルおよびトリエステル、ステアリン酸、ステアリン酸ナトリウム等であった。なお、原料シヨ糖脂肪酸エステルに対する収率は約33%であった。

#### 【0017】製造例2 シヨ糖ステアリン酸ジエステルのカラムクロマトグラフィーによる精製

- ① クロロホルム400mlを溶媒として市販品のカラムクロマトグラフィー用シリカゲル200gを膨潤させ、スラリー状としてカラムに充填し、製造法1によって得られたシヨ糖ステアリン酸エステルを約10g付加する。

② 以下の溶媒を順次用いて段階溶離を行う。

- i) メタノール：クロロホルム＝8：92（体積比）11
- ii) メタノール：クロロホルム＝15：85（体積比）11
- iii) メタノール：クロロホルム＝25：75（体積比）11

溶離液を70mlづつ分画し、ガスクロマトグラフィーとTLCを用いて分画した成分の同定、および純度の確認を行った。ジエステル画分を濃縮したところ、純度99%以上（ガスクロマトグラフィーおよびTLCによって不純物が検知されなかった）のショ糖ステアリン酸ジエステルが約4g分取できた。

#### 【0018】製造例3 ショ糖オレイン酸ジエステルのカラムクロマトグラフィーによる精製

① クロロホルム400mlを溶媒として市販品のカラムクロマトグラフィー用のシリカゲル200gを膨潤させ、カラムに充填し、ショ糖オレイン酸エステル約10gを付加する。

② 以下の溶媒を順次用いて段階溶離を行う。

- i) メタノール：クロロホルム＝6：94（体積比）11
- ii) メタノール：クロロホルム＝12：88（体積比）11
- iii) メタノール：クロロホルム＝20：80（体積比）11

溶離液を70mlづつ分画し、ガスクロマトグラフィーとTLCを用いて分画した成分の同定、および純度の確認を行った。ジエステル画分を濃縮したところ、純度99%以上（ガスクロマトグラフィーおよびTLCによって不純物が検知されなかった）のショ糖ステアリン酸ジエステルが約2.5g分取できた。次に前記製造例により得られたショ糖脂肪酸ジエステルを用いたベシクルおよびベシクル製剤の実施例を具体的に説明する。

#### 【0019】実施例1

アルブチン2重量%水溶液99gにベシクル形成剤（ショ糖ステアリン酸ジエステル（製造例2）97%、ステアリルトリメチルアンモニウムクロライド1%、セトステアリルアルコール2%）を1g加え、60℃で十分に膨潤させた後、ポリトロンで1分間処理し、直ちに25℃に冷却し、アルブチン内包ベシクルを調整した。このものをセファデックスG-50により、約25℃でゲル濾過し、アルブチンを内包したベシクルと外水相にあるアルブチンとに分離した。なお、溶離液としては1.32重量%ブドウ糖水溶液（アルブチン2重量%水溶液と等張）を用いた。ベシクル画分の全量を4倍量のエタノールと混合し、0.22μmのフィルターを用いて濾過し、UV吸収（282nm）を測定することによりベシクルに内包されたアルブチン量（ $a_{in}$ ）を定量した。同時に外水相にあるアルブチンの全量（ $a_{out}$ ）も定量し

た。両定量値の合計は配合したアルブチンの全量に一致した。これより、取り込み率＝ $a_{in} / (a_{out} + a_{in}) \times 100$ （%）を求めた結果、取り込み率は20.5%であった。

【0020】また、NICOMP-270（動的光散乱法）で測定したこのベシクルの平均粒子径は210nmであった。次にこのベシクルの安定性を内包されたアルブチンの放出量により評価した。上記ゲル濾過により精製したベシクルを5℃、25℃、37℃、50℃の温度に保存し、経時後、これを再度ゲル濾過し、ベシクルに内包されているアルブチン濃度（ $C_t$ ）を定量し、精製直後のベシクルに内包されていたアルブチン濃度（ $C_0$ ）の定量値とにより、放出率＝ $(C_0 - C_t) / C_0 \times 100$ （%）を求めた。結果は50℃においては1日後に放出率は約90%となり不安定であったが、37℃、25℃、5℃においては60日後においても各々、放出率はほぼ0%であった。なお、分散安定性はいずれもの条件においても、60日以上良好であった。

#### 【0021】実施例2

アルブチン2重量%水溶液98gにベシクル形成剤（製造例1で精製されたショ糖ステアリン酸ジエステル）2gを加え、60℃で十分に膨潤させた後、ポリトロンで1分間処理し、直ちに25℃に冷却し、アルブチン内包ベシクルを調整した。このものをセファデックスG-50により、約25℃でゲル濾過し、アルブチンを内包したベシクルと外水相にあるアルブチンとに分離した。なお、溶離液としては1.32重量%ブドウ糖水溶液（アルブチン2重量%水溶液と等張）を用いた。ベシクル画分の全量を4倍量のエタノールと混合し、0.22μmのフィルターを用いて濾過し、UV吸収（282nm）を測定することによりベシクルに内包されたアルブチン量（ $a_{in}$ ）を定量した。同時に外水相にあるアルブチン量（ $a_{out}$ ）も測定した。両定量値の合計は、配合したアルブチンの全量に一致した。これより、取り込み率＝ $a_{in} / (a_{out} + a_{in}) \times 100$ （%）を求め、取り込み率は28.2%であった。

【0022】また、NICOMP-270（動的光散乱法）で測定したこのベシクルの平均粒子径は215nmであった。次にこのベシクルの安定性を内包されたアルブチンの放出量により評価した。上記ゲル濾過により精製したベシクルを5℃、25℃、37℃、50℃の温度に保存し、経時後、これを再度ゲル濾過し、ベシクルに内包されているアルブチン濃度（ $C_t$ ）を定量し、精製直後のベシクルに内包されていたアルブチン濃度（ $C_0$ ）の定量値とにより、放出率＝ $(C_0 - C_t) / C_0 \times 100$ （%）を求めた。結果は50℃においては1日後に放出率は約90%となり不安定であったが、37℃、25℃、5℃においては60日後においても各々、放出率はほぼ0%であった。なお、分散安定性はいずれもの条件においても、60日以上良好であった。

## 【0023】実施例3

アルブチン2重量%水溶液99gにベシクル形成剤(シヨ糖ステアリン酸ジエステル97%、ステアシル硫酸Na1%、セトステアシルアルコール2%)1gを加え、60℃で十分に膨潤させた後、ポリトロンで1分間処理し、直ちに25℃に冷却し、アルブチン内包ベシクルを調整した。このものをセファデックスG-50により、約25℃でゲル濾過し、アルブチンを内包したベシクルと外水相にあるアルブチンとに分離した。なお、溶離液としては1.32重量%ブドウ糖水溶液(アルブチン2重量%水溶液と等張)を用いた。ベシクル画分の全量を4倍量のエタノールと混合し、0.22μmのフィルターを用いて濾過し、UV吸収(282nm)を測定することによりベシクルに内包されたアルブチン量( $a_{in}$ )を定量した。同時に外水相にあるアルブチン量( $a_{out}$ )を定量した。両定量値の合計は配合したアルブチンの全量に一致した。これより、取り込み率= $a_{in}/(a_{out}+a_{in}) \times 100$ (%)を求めた結果、取り込み率は21.0%であった。

【0024】また、NICOMP-270(動的光散乱法)で測定したこのベシクルの平均粒子径は205nmであった。次にこのベシクルの安定性を内包されたアルブチンの放出量により評価した。上記ゲル濾過により精製したベシクルを5℃、25℃、37℃、50℃の温度に保存し、経時後、これを再度ゲル濾過し、ベシクルに内包されているアルブチン濃度( $C_t$ )を定量し、精製直後のベシクルに内包されていたアルブチン濃度( $C_0$ )の定量値とにより、放出率= $(C_0-C_t)/C_0 \times 100$ (%)を求めた。結果は50℃においては1日後に放出率は約90%となり不安定であったが、37℃、25℃、5℃においては60日後においても各々、放出率はほぼ0%であった。なお、分散安定性はいずれの条件においても、60日以上良好であった。

## 【0025】実施例4

アルブチン2重量%水溶液98gにベシクル形成剤(シ

ヨ糖オレイン酸エステル(製造例3)92%、オレイン酸カリウム3%、オレイン酸5%)2gを加え、60℃で十分に膨潤させた後、ポリトロンで1分間処理し、直ちに5℃に冷却し、アルブチン内包ベシクルを調整した。このものをセファデックスG-50により、約5℃でゲル濾過し、アルブチンを内包したベシクルと外水相にあるアルブチンとに分離した。なお、溶離液としては1.32重量%ブドウ糖水溶液(アルブチン2重量%水溶液と等張)を用いた。ベシクル画分の全量を4倍量のエタノールと混合し、0.22μmのフィルターを用いて濾過し、UV吸収(282nm)を測定することによりベシクルに内包されたアルブチン量( $a_{in}$ )を定量した。同時に外水相にあるアルブチン量( $a_{out}$ )を定量した。両定量値の合計は配合したアルブチンの全量に一致した。これより、取り込み率= $a_{in}/(a_{out}+a_{in}) \times 100$ (%)を求めた結果、取り込み率は30.3%であった。

【0026】また、NICOMP-270(動的光散乱法)で測定したこのベシクルの平均粒子径は210nmであった。次にこのベシクルの安定性を内包されたアルブチンの放出量により評価した。上記ゲル濾過により精製したベシクルを5℃、25℃、37℃、50℃の温度に保存し、経時後、これを再度ゲル濾過し、ベシクルに内包されているアルブチン濃度( $C_t$ )を定量し、精製直後のベシクルに内包されていたアルブチン濃度( $C_0$ )の定量値とにより、放出率= $(C_0-C_t)/C_0 \times 100$ (%)を求めた。結果は5℃においては60日後においては放出率は0%で非常に安定であるが、50℃、37℃、25℃においては、それぞれ1日後の放出率が90%、72%、43%となり不安定であった。

## 【0027】

【発明の効果】以上説明したように本発明にかかるベシクルおよびベシクル製剤によれば、シヨ糖脂肪酸ジエステルを主な膜成分としたので、容易且つ安価に安定なベシクルを形成することが可能となる。